

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ C12P 1/06		(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2002년 03월 18일 10-0321304 2002년 01월 07일
(21) 출원번호	10-1999-0013598	(65) 공개번호	특2000-0066479
(22) 출원일자	1999년 04월 16일	(43) 공개일자	2000년 11월 15일
(73) 특허권자	한국과학기술연구원		
(72) 발명자	서울 성북구 하월곡2동 39-1 김창진 대전광역시유성구도룡동391타운하우스7동203호 박해룡 대전광역시유성구신성동144-1신성빌라102호 박동진 대전광역시대덕구법동보람아파트113동1106호 백남훈, 허상훈		
(74) 대리인	백남훈, 허상훈		

심사관 : 이처영

(54) 테이코플라닌의 정제방법

요약

본 발명은 테이코플라닌(teicoplanin)의 정제방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 테이코플라닌 생성 균주의 배양단계; 상기 배양액의 소수성 흡착 크로마토그래피 단계; 그리고, 당-친화성 크로마토그래피 단계를 포함하는 테이코플라닌 정제방법을 그 특징으로 하는 것으로서, 종전의 방법과 비교하여 그 과정이 단순할 뿐만 아니라, 배양과정에서 자가독성을 감소시킴으로써 그 수율도 증가시킬 수 있는 효과가 있다.

대표도

도 3

색인어

테이코플라닌

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명 정제방법에 따른 HP-20 수지 흡착 크로마토그래피 결과를 나타내는 그래프,
도 2는 본 발명 정제방법에 따른 콘카나발린 에이 수지 친화성 크로마토그래피 결과를 나타내는 그래프,
도 3은 본 발명 정제방법에 따라 정제된 시료의 HPLC 결과를 나타내는 그래프.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 테이코플라닌 (teicoplanin)의 정제방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 테이코플라닌 생성 균주를 이용한 테이코플라닌의 고수율 정제방법 및 그로부터 제조되는 항균활성을 갖는 테이코플라닌에 관한 것이다.

일반적으로, 항생물질이란 1mg/ml 이하의 저농도에서 다른 생물체의 생육을 저해하는 저분자 화합물을 말한다. 따라서 일반적으로 알려진 의약품 항생물질은 물론 항암제, 농업용 살균제, 제초제 및 살충제 등도 이 범주에 속한다고 할 수 있으며, 이러한 항생제는 항균활성, 작용기작, 생산균, 합성방법, 화학구

조 등에 따라 분류된다.

한편, 현재까지 약 10,000종 이상의 항생물질이 천연물로부터 분리되고 있으며, 항생물질의 50% 이상이 방선균류 (Actinomycetes)를 이용하여 생산되고 있다. 상기 항생물질 생산능을 갖는 방선균종 대부분은 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*)속에 속하는 것이다.

새로운 항생물질 생산균주 탐색은 1974년 이후로부터는 스트렙토마이세스 속 이외에도 희소 방선균까지 그 대상범위를 확대하여 유용한 항생물질들을 분리하였다.

한편, 항생제 생산의 발전에 따라 항생제의 과다사용이 야기되고 있는 바, 이에 약제내성균의 출현이 문제가 되고 있다. 이에, 항생제에 대한 내성을 갖는 병원균에 대해 효과적으로 대처하기 위해서, 내성 병원균에 대해 활성을 지닌 항생물질을 찾거나 작용범위가 좀 더 넓은 병원성 미생물의 선택적 제거 방법을 모색하고 있다. 더불어, 상기와 같은 작용을 하면서도 인간 및 동물 뿐만 아니라 농작물에도 독성이 없는 새로운 항생물질 생산을 위해서 많은 연구가 행해지고 있는데, 그 중 대표적인 것이 글라이코 펩타이드 (glycopeptide) 계열의 항생제이다.

상기 글라이코펩타이드계 항생제는 주로 그람양성균에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 글라이코펩타이드계 항생제의 구조적 특징은 R-기에 벤젠 고리를 갖는 다섯개 이상의 아미노산이 직선형으로 펩타이드를 형성하며, 각각의 아미노산 벤젠 고리에는 당, 염소 및 메틸기들이 종류에 따라 다르게 연결되어 있다는 것이다.

한편, 테이코플라닌 (teicoplanin)은 대표적인 글라이코펩타이드 계열의 항생제로서 현재 임상에서 사용되고 있다. 테이코플라닌은 극성 차이에 따라서 구분되는 T-A2-1 내지 T-A2-5의 복합체 그리고 T-A2의 정제 과정에서 생성되는 T-A3로 분류된다.

테이코플라닌의 항균활성 기작은 세포벽 합성과정에서 그람양성 균주에서 펩티도글리칸 (peptidoglycan) 합성의 중간체들이 서로 결합하는 것을 방해함으로써 결국 세포벽 합성을 저해하여 세균의 성장을 억제하는 것이다.

한편, 테이코플라닌은 약효가 우수하고 부작용이 적기 때문에 국내로의 수입이 매년 큰 폭으로 증가하고 있다. 그러나, 테이코플라닌은 화학적으로 합성이 어려울 뿐만 아니라, 아직까지 생합성 과정이 완전히 규명되지 않아 현재로서는 발효에 의한 대량 생산에 더 많은 연구가 요구되고 있다.

발효에 의한 테이코플라닌의 대량 생산에 있어서, 테이코플라닌 생산균주의 배양과정에서 나타나는 자가독성이 큰 문제가 되고 있는 바, 상기 자가독성은 대량생산에 있어서 심각한 저해현상을 나타내는 것이다.

한편, 테이코플라닌 생산균주의 배양액으로부터 테이코플라닌을 정제하는 방법에 대한 연구가 행해지고 있는 바, 그 중 다이펩타이드 친화성 크로마토그래피에 의한 정제방법이 있다 (*J. Applied Biochemistry*, 133-137(1985)). 그러나, 상기 방법은 수지의 재조합을 해야 하는 이유로 그 실시가 매우 어렵다는 단점이 있다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

본 발명자들은 상술한 자가독성의 문제 해결 및 신규 정제방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 중성수지를 테이코플라닌 생산균주의 배양액에 첨가하는 경우 자가독성이 감소됨을 확인하고, 테이코플라닌의 구조적 특징에 따라 선택되는 크로마토그래피 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 테이코플라닌의 고수율 정제방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 정제방법에 의해 제조되는 테이코플라닌을 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 테이코플라닌 생성 균주의 배양단계; 상기 배양액의 소수성 흡착 크로마토그래피 단계; 그리고, 당-친화성 크로마토그래피 단계를 포함하는 테이코플라닌 정제방법을 그 특징으로 한다.

본 발명은 상기 정제방법에 제조되는 테이코플라닌을 또 다른 특징으로 한다.

이와 같은 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다:

우선, 본 발명 정제방법에서 이용되는 테이코플라닌 생성 균주는 액티노플라네스 테이코마이세티커스 (*Actinoplanes teichomyceticus*)를 이용하는 것인 바, 이는 2차 대사산물로서 테이코플라닌을 생성하기 때문이다.

한편, 상기 배양단계에는 테이코플라닌에 의한 자가독성 현상을 감소시키기 위하여 추가적으로 중성수지가 첨가될 수 있으며, 이때 중성수지는 테이코플라닌 생성 균주의 지체기에 첨가되는 것이 바람직하다. 이와 같이 중성수지 첨가에 의해 자가독성 현상이 감소되는 것은, 균주에 의해 생성된 테이코플라닌이 상기 수지에 흡착됨으로써 배양액내의 테이코플라닌 농도가 감소되고, 이에 따라 균주가 직접 저해작용을 받지 않는 기작에 의해 테이코플라닌 생성이 방해받지 않기 때문이다.

한편, 상기 중성수지는 XAD-16, HP-20, 실리카겔 및 활성탄으로 구성된 그룹에서 선택되는 1종의 수지를 사용하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 HP-20을 사용하는 것이다. 또한, 상기 중성수지의 첨가량은 총배양액에 대해 3-7%가 바람직하며, 가장 바람직하게는 5%이다.

상술한 배양단계에 이어, 배양액을 소수성 흡착 크로마토그래피에 적용하는 바, 이때 이용되는 소수성 흡착크로마토그래피는 XAD-16, HP-20, 실리카겔 및 활성탄으로 구성된 그룹에서 선택되는 1종의 수지를 이용하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 HP-20 수지를 이용하는 것이다.

소수성 흡착 크로마토그래피에 배양액을 적용하여 테이코플라닌을 흡착시킨 다음, 흡착된 테이코플라닌을 용출하는 바, 이때 이용되는 용출액은 메탄올, 에탄올 및 부탄올로 구성된 그룹에서 선택되는 1종의 알코올이 바람직하며, 가장 바람직하게는 30-100%의 메탄올 단계 구배를 이용하는 것이다.

상술한 소수성 흡착 크로마토그래피 단계에 이어, 이 단계에서 분리된 테이코플라닌 활성분획을 당-친화성 크로마토그래피에 적용시키는 바, 이때 렉틴이 고정화된 수지를 이용하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 콘카나발린 에이 (concanavalin A), 렌틸 렉틴 (lentil lectin) 또는 맥아 렉틴 (wheat germ lectin)이 고정화된 수지를 이용하는 것이고, 가장 바람직하게는 콘카나발린 에이가 고정화된 수지를 이용하는 것이다.

당-친화성 크로마토그래피 단계에서 최종적으로 테이코플라닌 분획을 수득하기 위하여 수지에 결합된 테이코플라닌을 용출하는 바, 이때 사용되는 용출액은 포도당, 만노오스, α -메틸글루코사이드 및 α -메틸만노사이드로 구성된 그룹에서 선택되는 1종의 당을 포함하는 용액이 바람직하며, 가장 바람직하게는 α -메틸만노사이드의 0-0.5M 선형농도구배를 이용하는 것이다.

한편, 본 발명에서 이용되는 상술한 크로마토그래피는 테이코플라닌 구조에 있는 지방산 및 3개의 당부분에 특이적으로 분리양상을 나타내는 것 중에서 선택된 것이다. 본 발명에 따른 균주배양 단계 및 소수성 흡착 크로마토그래피 단계에 적용되는 XAD-16 및 HP-20는 크로마토그래피를 수행하는데 사용되는 수지로서 당분야에서는 관용명으로 불리워지고 있다. 참고로, 본 발명에 따른 크로마토그래피를 수행하는데 사용하는 XAD-16 및 HP-20의 화학적 구조 및 물성을 간단히 정리하여 나타내면 다음과 같다.

구 분	XAD-16	HP-20
화학구조	거대망상의 교차결합된 방향족 중합체	폴리스티렌과 디비닐벤젠의 공중합체
작 용 기	소수성 분자	벤젠고리 부분
형 상	반투명 구(球)	다공성의 구(球)
입자크기(μm)	560~710	250 이상
겉보기밀도(g/L)	720	680
제 품	Rohm and Haas (Amberlite XAD-16)	Mitsubishi Chemical Co. (Diaion HP-20)

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 액티노플라네스 테이코마이세티커스로부터 테이코플라닌의 정제

단계 1 : 균주의 배양

액티노플라네스 테이코마이세티커스 (ATCC 31121) 균주를 100mL 본배양 배지 (포도당, 효모즙, 아스파라긴, 황산마그네슘, 염화나트륨 및 염화칼슘)에서 28℃에서 7일동안 배양하였다.

단계 2 : 소수성 흡착 크로마토그래피

상기 과정에 의해 배양된 배양액 100mL을 10% 가성소다(NaOH) 1mL를 사용하여 pH 11로 조정한 후 1시간 동안 교반하고, 원심분리기에서 3000rpm으로 30분 동안 원심분리를 한 다음 상등액 85mL를 직경 2cm, 높이 30cm의 유리관에 충전된 HP-20 (Diaion HP-20, Mitsubishi kasei사, 일본)에 흡착시켰다. 이어, 메탄올 30%, 50%, 80% 및 100%의 농도로 단계별 용출을 행하였다.

그 결과 50% 및 80% 메탄올 분획이 활성 분획으로 나타났는 바, 이에 생산된 테이코플라닌은 HP-20에 잘 흡착되며 50-80% 메탄올에 의해 용이하게 탈착됨을 확인할 수 있었다 (참조: 도 1).

한편, 각각 분획의 활성조사, 즉 항균작용은 시험균으로서 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)를 사용하는 한천 확산법 (J. Antibiotics, 61, 5-620(1984))에 의해 미생물학적으로 분석하였다.

단계 3 : 친화성 크로마토그래피

상기 단계 2에서 수득한 활성분획을 감압증류 방법으로 농축한 후 5mM 아세트산 나트륨 (pH 5.2) 완충용액 2mL에 용해시켰다. 이어, 상기 용액 2mL를 직경 0.5cm, 높이 10cm의 유리관에 충전된 콘카나발린 에이 (Pharmacia사)에 흡착시킨 후 α -메틸만노사이드 (α -methylmannoside)의 0-0.5M 선형농도구배를 이용하여 용출하였다.

그 결과 α -메틸만노사이드 0.1-0.2M 농도에서 활성분획, 즉 테이코플라닌이 용출됨을 알 수 있었다 (참조: 도 2).

한편, 최종적으로 정제된 시료를 이용하여 인산완충용액의 농도구배를 사용함으로써 HPLC를 수행하였으며, 이때 분석조건으로 직경 4.6mm, 길이 250mm의 칼럼 (YMC-Pack ODS-A, YMC Inc., 독일)을 사용하였으며, 유속은 분당 1ml이었다. 그 결과는 첨부 도 3과 같다. 테이코플라닌은 구조상 성분이 서로 다른 지방산에 의해 복합체 (T-A2-1~T-A2-5)로 구성되어 있으며 (*J. Antibiotics*, 361-366(1988))도 3에서 본 발명 정제방법에 의한 테이코플라닌은 T-A2-2는 32.047분, T-A2-3는 32.954분, T-A2-4는 36.253분, T-A2-5는 36.960분 피크에 해당하는 것이다. 상기 과정에 의해 최종적으로 정제된 테이코플라닌은 정제도 95%이고, 수율이 80%이었다.

상술한 바와 같이, 본 발명의 정제방법은 기존의 정제방법인 다이펄타이드를 이용하는 것보다 간편하며 또한 수지의 재활용이 가능하다는 이점이 있다.

실시예 2: 액티노플라네스 테이코마이세티커스로부터 분리된 테이코플라닌의 자가독성 시험

액티노플라네스 테이코마이세티커스 (ATCC 31121)의 발효 배양액 100ml에 임의적으로 테이코플라닌 (제일약품)을 25, 50, 100 및 200mg/l 의 농도로 첨가한 다음, 28℃에서 4일 동안 배양하고, 액티노플라네스 테이코마이세티커스에 의한 테이코플라닌 생산성을 조사하였다 (참조: 표 1).

[표 1]

테이코플라닌 첨가량 (mg/l)	테이코플라닌 생성량 (mg/l)
0	30
25	35
50	43
100	70
200	92

상기 표 1에서 확인할 수 있듯이, 50mg/l 이상의 테이코플라닌을 첨가하는 경우에는 균주에 의한 테이코플라닌의 생합성이 저해되는 현상이 발생하였으며, 100mg/l 이상의 농도에서는 첨가한 테이코플라닌의 양이 오히려 감소하였다.

상기 결과로부터 발효중에 생성되는 테이코플라닌은 균주의 성장에 심각한 저해 작용을 함을 알 수 있었다.

실시예 3: 액티노플라네스 테이코마이세티커스의 발효에 미치는 중성수지의 영향

상기 실시예 2에서 확인한 테이코플라닌 생산에 따른 자가독성의 영향을 감소시키기 위하여, 액티노플라네스 테이코마이세티커스 (ATCC 31121) 발효 배양액에 중성수지를 첨가하였는 바, HP-20, XAD-16, 활성탄 및 실리카겔을 각각 5%의 농도로 발효 배양액 100ml에 첨가한 후 28℃에서 7일동안 배양하였다. 이어서, 배양액에서 중성수지를 수거하고 100% 메탄올로 용출시킨 다음 분획분을 수득하였다.

한편, 배양액 및 메탄올 분획분의 테이코플라닌 항균작용은 상기 실시예 1에 개시된 한천 확산법에 따라 측정하였다.

[표 2]

첨가 중성수지	배 양 액			메탄올 분획		
	15*	30	60	15	30	60
대조구**	11.0***	12.5	14.5	-	-	-
활성탄	-	-	-	-	-	-
XAD-16	-	-	-	12.5	14.5	16.0
HP-20	-	-	-	13.5	15.0	17.0
실리카겔	-	-	12.0	-	-	-
* : 종이 디스크 당 분주량						
** : 중성수지를 첨가하지 않은 경우						
***: 저지판의 크기(mm)						

상기 표 2에서 확인할 수 있듯이, 배양액에 중성수지 HP-20를 첨가하는 경우 자가독성이 가장 크게 억제되어 테이코플라닌 생산성이 가장 우수함을 알 수 있었다.

실시예 4: 액티노플라네스 테이코마이세티커스의 발효액에 첨가되는 HP-20의 최적 농도 및 시기

상기 실시예 4에서 자가독성 억제제가 가장 우수한 HP-20을 액티노플라네스 테이코마이세티커스 (ATCC 31121)의 발효 배양액 100ml에 1%, 3%, 5% 및 10%의 농도로 첨가한 다음, 28℃ 및 150 rpm의 조건하에서 7일동안 배양하였다. 테이코플라닌의 생성량은 상기 실시예 1에 개시된 한천확산법에 따라 측정하였다. 그 결과는 표 3과 같다.

[표 3]

HP-20의 농도 (%)	테이코플라닌 생성량 (mg/l)
0	20
1	52
3	126
5	134
10	95

상기 표 4에서 확인할 수 있듯이, HP-20의 농도가 5%일 때 테이코플라닌 수율이 가장 높았으며 그 이상에서는 다소 감소하는 경향을 나타내었다.

한편, HP-20의 가장 적합한 첨가 시기를 결정하기 위하여, 액티노플라네스 테이코마이세티커스 (ATCC 31121)의 발효 배양액 100ml에 24시간 간격으로 농도 5%가 되도록 HP-20을 첨가하여 28℃ 및 150 rpm의 조건하에서 배양하였다. 테이코플라닌의 생성량은 상기 실시예 1에 개시된 한천확산법에 따라 측정하였다. 그 결과는 표 4와 같다.

[표 4]

HP-20의 농도 (%)	HP-20의 첨가 시간(시)	테이코플라닌 생성량 (mg/l)
0	-	20
5	0	134
5	24	125
5	48	83
5	72	63
5	96	55
5	120	52
5	144	43

상기 표 5에서 확인할 수 있듯이, 배양 초기에 첨가하는 것이 HP-20에 의한 테이코플라닌 자가독성 억제 효과가 가장 우수하였으며 첨가하는 시간이 늦어짐에 따라 테이코플라닌의 생산성이 낮아짐을 알 수 있었다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하였듯이, 본 발명은 테이코플라닌의 정제방법 및 그로부터 제조되는 테이코플라닌을 제공한다. 본 발명은 정제방법은 그 과정이 종전의 방법과 비교하여 단순할 뿐만 아니라, 배양과정에서 자가독성을 감소시킴으로써 그 수율도 증가하는 효과가 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

다음과 같은 단계를 포함하는 테이코플라닌의 정제방법:

- (i) 테이코플라닌 생성 균주 배양액에 XAD-16, HP-20, 실리카겔 및 활성탄 중에서 선택된 중성수지를 첨가하여 균주를 배양하는 단계;
- (ii) 상기 배양액을 XAD-16, HP-20, 실리카겔 및 활성탄 중에서 선택된 중성수지가 충전된 소수성 흡착 크로마토그래피에 적용하여 테이코플라닌을 흡착시키는 단계; 그리고
- (iii) 상기 분리된 테이코플라닌 활성분획을 렉틴(lectin)이 고정화된 수지가 충전된 당-친화성 크로마토그래피에 적용하여 용출시키는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 테이코플라닌 생성 균주는 방성균인 것을 특징으로 하는 테이코플라닌의 정제방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에서 있어서, 상기 테이코플라닌 생성 균주는 액티노플라네스 테이코마이세티커스 (*Actinoplanes teichomyceticus*)인 것을 특징으로 하는 테이코플라닌의 정제방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 배양 단계에 첨가되는 중성수지는 테이코플라닌 생성 균주의 지체기에 첨가되는 것을 특징으로 하는 테이코플라닌의 정제방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1 항 또는 제 5 항에 있어서, 상기 배양 단계에 첨가되는 중성수지의 첨가량은 3 ~ 7%인 것을 특징으로 하는 테이코플라닌의 정제방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 소수성 흡착 크로마토그래피 단계에서 사용되는 용출액은 메탄올, 에탄올 및 부탄올로 구성된 그룹에서 선택되는 1종의 알코올 용액인 것을 특징으로 하는 테이코플라닌의 정제방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 용출액은 메탄올인 것을 특징으로 하는 테이코플라닌의 정제방법.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 상기 소수성 흡착 크로마토그래피 단계는 30-100%의 메탄올 단계 구배를 이용하는 용출과정을 포함하는 것을 특징으로 하는 테이코플라닌의 정제방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

제 1 항에 있어서, 상기 수지에 고정화된 렉틴은 콘카나발린 에이, 렌탈 렉틴 및 맥아 렉틴으로 구성된 그룹에서 선택되는 1종의 것임을 특징으로 하는 테이코플라닌의 정제방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 수지에 고정화된 렉틴은 콘카나발린 에이인 것을 특징으로 하는 테이코플라닌의 정제방법.

청구항 17

제 1 항에 있어서, 상기 당-친화성 크로마토그래피 단계에서 사용되는 용출액은 포도당, 만노오스, α -메틸글루코사이드 및 α -메틸만노사이드로 구성된 그룹에서 선택되는 1종의 당을 포함하는 것을 특징으로 하는 테이코플라닌의 정제방법.

청구항 18

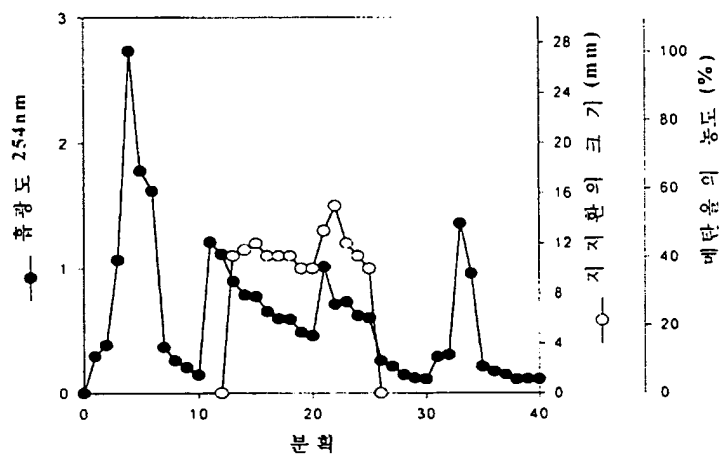
제 1 항에 있어서, 상기 당-친화성 크로마토그래피 단계는 α -메틸만노사이드의 0-0.5M 선형농도구배를 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 테이코플라닌의 정제방법.

청구항 19

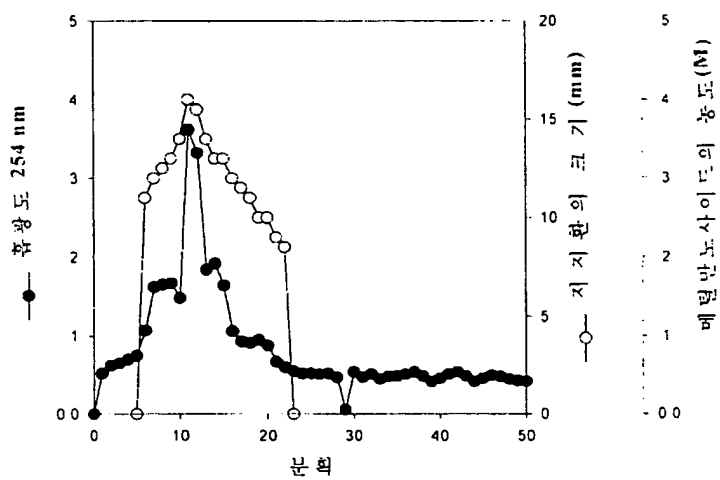
삭제

도면

도면1



도면2



도면3

